

Germinación asimbiótica *in vitro* de semillas de orquídeas silvestres

Loexis Rodríguez*, Roberto González, Karen Alvarado, Enidia Telles. *Autor para correspondencia.

Centro de Desarrollo de la Montaña. Limonar de Monte Ruz, El Salvador, Guantánamo.
e-mail: loexis@cdm.gtmo.inf.cu

RESUMEN

Dentro de la flora orquídeológica de Cuba existen especies en diferentes categorías de amenaza y no se conocen vías para lograr su reproducción de forma masiva y en el menor tiempo posible. Por tales razones, la realización de este estudio estuvo encaminado a lograr la germinación *in vitro* de semillas de 15 especies de orquídeas silvestre cubanas como una contribución a su rescate y conservación. Se colectaron cápsulas de *Bletia patula*, *Encyclia gravida*, *Encyclia oxypetala*, *Encyclia phoenicea*, *Epidendrum nocturnum*, *Epidendrum secundum*, *Epidendrum wrightii*, *Eulophia alta*, *Oncidium luridum*, *Phaius tancarvilleae*, *Physinga polygonatum*, *Polystachya concreta*, *Polystachya foliosa*, *Prosthechea fragans* y *Schomburgkia lyonsii* que se lavaron y desinfectaron. Para evaluar la germinación de las semillas de cada especie se emplearon tres medios de cultivo. Los resultados permitieron conocer por vez primera las posibilidades para la germinación asimbiótica *in vitro* de las especies mencionadas. Se comprobó la germinación de semillas de nueve especies en un periodo comprendido entre seis y 40 semanas así como la gran variabilidad de respuestas en este proceso entre las especies.

Palabras clave: biotecnología, carbón activado, especies nativas, flores

ABSTRACT

Among Cuban orchid species they are gathered in different threaten categories. There are not reports on how to achieve their mass propagation and in a short term. For these reasons, the study was aimed to achieve *in vitro* germination of seeds of fifteen species of wild Cuban orchids. This is also a contribution to the rescue and conservation of wild Cuban orchids. Capsules of *Bletia patula*, *Encyclia gravida*, *Encyclia oxypetala*, *Encyclia phoenicea*, *Epidendrum nocturnum*, *Epidendrum secundum*, *Epidendrum wrightii*, *Eulophia alta*, *Oncidium luridum*, *Phaius tancarvilleae*, *Physinga polygonatum*, *Polystachya concreta*, *Polystachya foliosa*, *Prosthechea fragans* and *Schomburgkia lyonsii* were collected, washed and disinfected. Three culture media were used to assess germination of seeds in each species. Results showed, for the first time, the possibilities for *in vitro* asymbiotic germination of the listed species. Germination of nine species in a period between six and forty weeks was proved. Also the wide variability of responses in this process among the species was observed.

Key words: activated charcoal, biotechnology, flowers, native species

INTRODUCCIÓN

Las semillas de orquídeas crecen lentamente y requieren años para que la planta florezca. Algunas especies florecen más temprano, pero otras necesitan de tres a cinco años, por lo que la paciencia es el primer requerimiento para aumentar la población de una especie determinada. Sin embargo, es posible disminuir este tiempo e incrementar las poblaciones de orquídeas a través de las técnicas biotecnológicas (Villalobo, 1990).

Las regiones montañosas son las más ricas en orquídeas. Algunas especies solo se pueden encontrar por encima de los 600 a 700 m.s.n.m. Cuba oriental, con los complejos montañosos del norte (Sierras de Nipe y Cristal, Moa y Baracoa) y la Sierra Maestra, posee una gran riqueza. Lugares

como la Gran Piedra y el parque Alejandro de Humbolt constituyen verdaderos jardines naturales.

Pierick (1994), argumentó que la deforestación de los bosques, la degradación de los ecosistemas montañosos y la contaminación ambiental han conllevado a que algunas especies se encuentren en peligro de extinción.

Desde hace más de dos décadas se vienen realizando investigaciones en orquídeas cubanas como parte de los estudios que se llevan a cabo sobre la flora de Cuba. Las principales investigaciones se realizan en el campo de la taxonomía, estudios florísticos, inventarios y conservación, y recientemente se han iniciado además algunos trabajos sobre biología de la reproducción y epifitismo.

Los trabajos relacionados con la propagación *in vitro* de orquídeas cubanas se han realizado de forma aislada y a pequeña escala. Sin embargo, dentro de la flora orquideológica de Cuba existen especies en diferentes categorías de amenaza y sin el menor conocimiento para lograr su reproducción de forma masiva y en el menor tiempo posible. Por tales razones, la realización de este estudio estuvo encaminado a lograr la germinación *in vitro* de semillas de 15 especies de orquídeas silvestre cubanas como una contribución a su rescate y conservación.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en el Centro de Desarrollo de la Montaña (CDM) y el material vegetal de partida utilizado provino del Banco de Germoplasma *ex situ* de orquídeas silvestres del propio Centro (Figura 1).

Las especies utilizadas fueron las siguientes: *Bletia patula* Graham, *Encyclia gravis* (Lindl.) Schltr, *Encyclia oxypetala* (Ldl.) Acuña, *Encyclia phoenicea* (Ldl.) Neum, *Epidendrum nocturnum* Jacq, *Epidendrum secundum* Jacq, *Epidendrum wrightii* Ldl., *Eulophia alta* (L.) Fawc. et Rendle, *Oncidium luridum* Lindl., *Phaius tancarvilleae* (Banks) Blume, *Physinga polygonatum*, *Polystachya concreta* (Jacq.) Garay y Sweet, *Polystachya foliosa* (Hook.) Rchb. F., *Prosthechea fragrans* (Sw.) W. E. Higgins y *Schomburgkia lyonsii* Lindl.

Se colectaron cápsulas verdes (entre 60 y 80 días después de la polinización) que se lavaron con

detergente al 1.0%. Después de enjuagadas se sumergieron durante cinco minutos en solución de hipoclorito de sodio (NaOCl) al 1.0% de cloro activo al que se le añadieron dos gotas de Tween 20. Los enjuagues se realizaron con agua destilada estéril.

Posteriormente, en la cabina de flujo laminar las cápsulas se sumergieron en una solución de sulfato de cobre al 2.0% durante 5.0 minutos, luego en hipoclorito de sodio (NaOCl) al 1.0%, y finalmente se enjuagaron con suficiente agua destilada estéril. Antes de ser seccionadas, las cápsulas fueron sumergidas en alcohol al 70% y flameadas.

Las semillas se extrajeron de las cápsulas y fueron distribuidas de forma homogénea sobre los medios de cultivo.

Se emplearon 10 frascos de 250 ml de capacidad para cada variante experimental (15 especies y cuatro tipos de medios de cultivo), a los que se les añadieron 25 ml de medio de cultivo constituido por las sales inorgánicas Knudson (1946), Vacin y Went (1949), Murashige y Skoog (1962) al 50% o Morel (1965) con agua de coco (10%), sacarosa (2.0%), carbón activado (0.0 y 0.15%) y se solidificaron con agar técnico # 3 al 0.7%. El pH fue ajustado a 5.6 antes de la esterilización.

Los frascos se incubaron a la oscuridad durante siete días y luego a 16 horas luz de fotoperíodo a intensidad de $27 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ y $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Se observó semanalmente la presencia de fenolización y se cuantificó el número de semillas germinadas.



Figura1. Vista parcial del banco de germoplasma *ex situ* de orquídeas silvestres

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las cuatro formulaciones de medios de cultivo se favoreció la germinación de las semillas de nueve (60%) de las 15 especies evaluadas. Del resto, tres se fenolizaron y no germinaron (*Bletia patula*, *Encyclia gravis*, *Epidendrum wrightii*) y en tres no se observó ninguna respuesta (*Physinga polygonatum*, *Polystachia concreta*, *Prosthechea fragrans*).

La fenolización estuvo presente de manera parcial o total en 10 (67%) de las 15 especies evaluadas. Tisserat y Jones (1999), coincidieron en plantear que la exudación de fenoles fitotóxicos durante el cultivo de tejidos de orquídeas constituye un serio problema para su cultivo *in vitro*, y que la vía más efectiva para solucionar este problema es realizar cambios frecuentes al medio de cultivo y/o añadir carbón activado.

Solo dos del total de las especies que germinaron pudieron lograrlo con y sin carbón activado en el medio de cultivo (*Epidendrum nocturnum* y *Epidendrum secundum*) en tanto las restantes siete necesitaron de este compuesto para germinar, en su ausencia las semillas se fenolizaron. Es importante destacar que cuando *Epidendrum nocturnum* germinó sin la adición de carbón activado al medio de cultivo, disminuyó en una semana el tiempo para germinar en presencia de las sales MS comparado con el periodo que necesitaron cuando sí estuvo presente. En tanto, *Epidendrum secundum* disminuyó el mismo periodo de tiempo con iguales condiciones en todos los medios de cultivo. Además, en todos los medios de cultivo sin carbón activado el porcentaje de germinación fue menor (Figura 2).

La adición al medio de cultivo de carbón activado es un método que ha sido empleado por una gran

cantidad de autores (Thompson, 1980; Singh, 1993; George, 1996; Pérez, 1998; Tisserat y Jones, 1999; Yang *et al.*, 1999; McKendrick, 2000) y se ha demostrado que influye positivamente en la germinación y el crecimiento de las orquídeas sobre todo de aquellas que son propensas a la fenolización.

Arditti y Ernst (1993), plantearon que entre las posibles explicaciones al efecto positivo que ejerce el carbón activado en el cultivo de tejidos de orquídeas se encuentra el aumento de la aireación del medio de cultivo. Una segunda razón es que absorbe el etileno el cual puede inhibir el crecimiento y la diferenciación, y basado en el estudio de las características de absorción y cambios que se producen en el medio de cultivo durante la esterilización el carbón activado absorbe el 5-hidroximetilfurfural que se forma por la deshidratación de la sacarosa durante este proceso el cual es inhibidor del crecimiento así como productos fenólicos y carboxílicos producidos por los tejidos. El carbón activado también puede absorber las hormonas vegetales y las vitaminas lo que explica por qué en ocasiones puede ser inhibidor del crecimiento.

Encyclia oxypetala germinó en todas las formulaciones de sales de medios de cultivo cuando se empleó carbón activado, sin embargo, mostró cambios con respecto al resto de las especies en cuanto al tiempo para la germinación según el tipo de medio de cultivo con intervalos de hasta cuatro semanas entre el periodo más corto y el más tardío de germinación.

Por otra parte, *Encyclia phoenicea*, *Polystachya foliosa*, *Schomburgkia lyonsii*, *Phaius tancarvillei* y *Eulophia alta* fueron más específicas que las demás especies en cuanto al tipo de sales para lograr la germinación y siempre con carbón activado. Las preferencias que muestran las especies por un

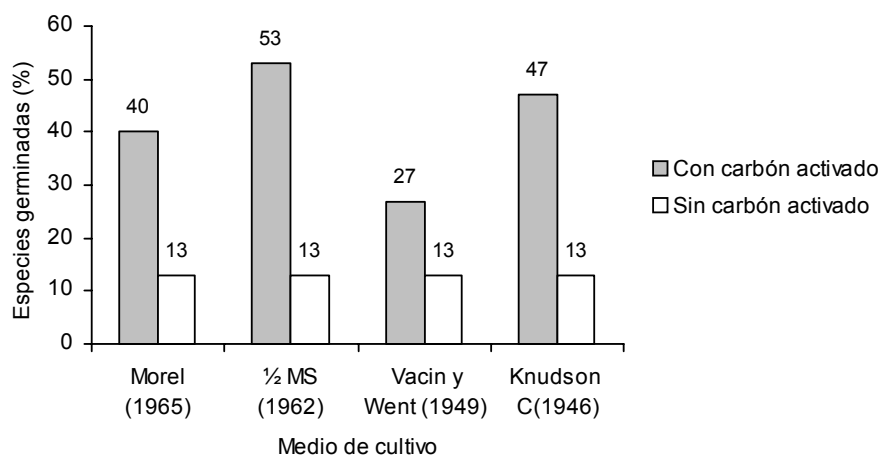


Figura 2. Efecto de la adición de carbón activado en diferentes medios de cultivo sobre la germinación *in vitro* de semillas de 15 especies de orquídeas silvestres

medio de cultivo determinado tienen lugar debido a que varían de un genotipo a otro las exigencias nutritivas, por eso muchas especies pueden proliferar muy bien en medios de cultivo simples como el Knudson C (1946), pero otras requieren de medios más complejos para la germinación (Singh, 1993).

Vale destacar que *Encyclia oxypetala* fue la especie más precoz en germinar (6 semanas), en tanto que *Phaius tancarvilleae* y *Eulophia alta* con 32 y 40 semanas, respectivamente fueron de las especies que germinaron las que más demoraron en hacerlo. George (1996), planteó que las especies terrestres no germinan bien en los medios de cultivo utilizados normalmente para orquídeas epífitas, y que en ocasiones no toleran altas concentraciones de sales y otras solo germinan en presencia de nitrógeno orgánico o inorgánico.

Rodríguez *et al.* (2001), realizaron estudios similares para evaluar la germinación de las semillas de cuatro especies de orquídeas silvestres. Sus resultados también mostraron diversidad de respuestas de las especies en los diferentes medios de cultivo. De igual forma, la mayor parte de las especies no respondió ante la ausencia de carbón activado y el periodo para la germinación estuvo entre los valores alcanzados en la presente investigación.

Las diferencias en las respuestas a la germinación teniendo en cuenta los factores analizados, también han tenido lugar en experimentos realizados con otras especies por McKendrick (2000), quien planteó la gran influencia que ejerce el genotipo en estos casos, lo que obliga a un estudio detallado para cada especie.

Es oportuno referir que existen otros factores que influyen en la germinación de las semillas de orquídeas y que no han sido evaluados en esta experiencia como lo es el estado de madurez de las cápsulas, lo cual tiene una incidencia particular para cada especie pero que, de modo general, puede reportar beneficios importantes en el proceso de germinación.

CONCLUSIONES

La investigación permitió conocer las posibilidades para la germinación asimbiótica *in vitro* de las especies estudiadas, donde se destaca la germinación de nueve especies en un periodo comprendido entre seis y 40

semanas. Se puso de manifiesto además el efecto positivo del carbón activado en el medio de cultivo para la germinación *in vitro* de las semillas contrarrestando la fenolización así como la gran variabilidad de respuestas en este proceso entre las especies.

REFERENCIAS

- Arditti, J, Ernst, R (1993) Micropropagation of Orchids. John Wiley-Sons, INC. New York
- George, E F (1996) Propagation by Tissue Culture, pp. 575-1361. Second Edition Exegetics Ltd. Edington, Wilts. England
- Knudson, L (1946) A New Nutrient Solution for Germination of Orchid Seeds. *Ibid.* 15: 214-217
- McKendrick, S (2000) Manual para la germinación *in vitro* de Orquídeas. Ceiba Fundación para la Conservación Tropical. Universidad San Francisco de Quito
- Morel, G (1965) A new means of clonal propagation of orchids. *Amer. Orch. Soc. Bull.* 473 – 477
- Murashige, T y Skoog, F S (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Plant Physiology* 15: 173-197
- Pérez J N (1998) (Ed.) Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. IBP. Santa Clara
- Pierik, R L M (1994) Biotecnología Vegetal como herramienta en la Horticultura Ornamental. *Chapingo* 1 (1): 45-57
- Rodríguez, L, González R, Alvarado K, Téllez E, Díaz A, Sánchez E (2001) Germinación asimbiótica *in vitro* de semillas de cuatro especies de orquídeas cubanas. *Biotecnología Vegetal* 1 (2):115-116
- Singh, F (1993) *In Vitro* Orchid Seed Germination and Cloning of Orchids. En: *Plant Biotechnology*. Science publishers, Inc. Lebanon, USA. 289 p.
- Thompson, P A (1980) Orchids from Seed. Royal Botanic Gardens New Wakehurst place
- Tisserat B, Jones D (1999) Clonal propagation of Orchids. En: Hall R D (Ed.) *Plant Cell Culture Protocols*, pp. 127 – 134. CPRO – DLO. Wageningen
- Vacin, E, Went F (1949) Some pH changes in nutrient solutions. *Bot. Gaz.* 110: 605 – 613
- Villalobos, V N (1990) Historia del Cultivo de Tejido Vegetal. En: Rossel T, J N Villalobos (Eds) *Fundamentos Teóricos – Prácticos del Cultivo de Tejido Vegetales*. FAO. Roma
- Yang, J, Lee H J, Shin D H, Oh SK, Seon J H, Paek K Y, Han K H (1999) Genetic transformation of *Cymbidium* orchid by particle bombardment. *Plant Cell Reports* 18: 978-984